BASIC

ELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
LDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
MENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

D/E D16

C07H 1/08, 21/00, C12N 15/10

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/34569

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. December 1995 (21.12.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00787

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Juni 1995 (14.06.95)

(30) Prioritätsdaten:

| | | |
|---|---|---|
| P 44 22 040.5 | 14. Juni 1994 (14.06.94) | DE |
| P 44 22 044.8 | 14. Juni 1994 (14.06.94) | DE |
| P 44 47 015.0 | 30. December 1994 (30.12.94) | DE |

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: INVITEK GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HILLEBRAND, Timo [DE/DE]; Bansiner Strasse 60, D-12619 Berlin (DE). BENDZKO, Peter [DE/DE]; Iffländstrasse 32, D-12623 Berlin (DE). PETERS, Lars-Erik [DE/DE]; Mollendorfstrasse 71, D-10367 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.*

*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

(54) Title: UNIVERSAL PROCESS FOR ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS FROM EXTREMELY SMALL AMOUNTS OF HIGHLY CONTAMINATED VARIOUS STARTING MATERIALS

(54) Bezeichnung: UNIVERSELLES VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS EXTREM GERINGEN MENGEN SOWIE SEHR STARK VERUNREINIGTEN UNTERSCHIEDLICHSTEN AUSGANGSMATERIALIEN

(57) Abstract

A universal process is disclosed for extracting and purifying nucleic acids from extremely small amounts of highly contaminated various biological and other starting materials. The invention has applications in forensic medicine, medical diagnosis, molecular biology, biochemistry, genetic technology and all related fields. The process is characterised in that nucleic acid-containing materials are lysed, the lysate is incubated with a non-porous, non-structured, highly disperse, homogeneous and chemically pure $SiO_2$ substrate, the substrate is isolated with the bound nucleic acids and washed with a buffer solution, then the nucleic acids are dissolved from the substrate by a buffer with a lower salt concentration. Lysis of the material and nucleic acid immobilisation are preferably carried out in a reaction vessel. The substrate particles have a size of 7-40 nm, preferably 40 nm, and a specific surface from 50-300 g/m², preferably 50 g/m².

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein universell einsetzbares Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus extrem geringen wie auch extrem mit Verunreinigungen kontaminierten unterschiedlichsten biologischen und anderen Ausgangsmaterialien. Anwendungsgebiete sind die forensische Medizin, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadürch gekennzeichnet, daß Nukleinsäuren enthaltende Materialien lysiert, das Lysat mit einem nichtporösen und unstrukturierten, hochdispersen sowie homogenen chemisch reinen $SiO_2$-Träger inkubiert, der Träger mit den gebundenen Nukleinsäuren abgetrennt und mit Pufferlösung gewaschen wird und nachfolgend die Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Salzkonzentration vom Träger abgelöst werden. Die Lyse des Materials und die Bindung der Nukleinsäuren werden bevorzugt in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Die verwendeten Trägerpartikel weisen eine Korngröße von 7-40 nm, vorzugweise 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 50-300 g/m², vorzugsweise 50 g/m² auf.

Auch ist die Bindung von zellulärer Gesamt-RNS an z.B. silicageltragende Säulen bekannt und als Reagenziensystem auch verfügbar, realisiert dabei aber nicht eine vollständige Isolierung von zellulärer Gesamt-RNS, da kleinere RNA Spezies (<200 bp) nicht mehr isoliert werden können. Somit kann z.B. eine solche RNS nicht mehr erfolgreich für DDRT-PCR Anwendungen (Isolierung sämtlicher mRNA Spezies einer Zelle) eingesetzt werden, da von vornherein kleine RNS-Spezies nicht vorhanden sind. Desweiteren besteht mit solchen Systemen auch nicht die Möglichkeit der Isolierung von RNS aus extrem geringen Mengen an Ausgangsmaterialien. Obwohl Verfahren der Isolierung, wie auch Reinigung von Nukleinsäuren über das bekannte Prinzip der Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Materialien, mittlerweile weitverbreitet sind, werden eine Reihe von speziellen Anwendungen der Isolierung von Nukleinsäuren, mit bisher bekannten Isolierungssystemen (und den verwendeten Trägermaterialien) nicht oder in keiner Weise zufriedenstellend gelöst.

Dies betrifft:

1. die Isolierung von Nukleinsäuren (genomische DNS, total RNS) aus extrem geringen Mengen an Ausgangsmaterialien (z.B. <0.5mg Gewebematerial; <0.5µl Blut oder Blutspuren auf Kleidungsstücken; <5µl Speichel; <$10^3$ Zellen),
2. die Verfügbarkeit eines universellen Systems für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einem sehr breiten Spektrum unterschiedlichster Ausgangsmaterialien (d.h. Isolierung von Nukleinsäuren aus 'einfachen Ausgangsmaterialien' wie Zellkulturen oder Vollblut wie auch aus extrem schwierigen Ausgangsmaterialien wie Uraltknochen oder Stuhlmaterialien),
3. die Isolierung von Nukleinsäuren aus stark kontaminiertem Ausgangsmaterial in einer Qualität, die es erlaubt, die isolierten Nukleinsäuren auch als Substrat für enzymatisch Nachfolgereaktionen (z.B. PCR) auch mit Erfolg einsetzen zu können.

Gerade solche kontaminationsbeladenen Ausgangsmaterialien sind für bestimmte klinisch relevante Fragestellungen für die Diagnostik, für forensische Untersuchungen bzw. für die Klärung evolutionsbiologischer Fragestellungen von großer Bedeutung. Es

handelt sich dabei vor allem um solch 'interessierenden' Ausgangsmaterialien wie Knochen oder Blutspuren auf Kleidungsstoffen (forensische Medizin), Uraltknochen (Evolutionsbiologie), Speichel, Bronchialauswurfmaterial und Stuhlproben (medizinische Diagnostik). Wie schon aufgeführt ist es z.B. nicht möglich amplifikationsfähige DNS aus Speichelproben unter Verwendung von Glasmilch zu isolieren. Noch komplizierter stellt sich dieses Problem dar, wenn DNS aus Stuhlproben isoliert werden soll. Nach dem gegenwärtigen Stand der Technik muß eindeutig festgestellt werden, daß es noch kein funktionierendes schnelles Isolierungsverfahren gibt (weder kommerziell verfügbar, noch publiziert), um amplifikationsfähige Nukleinsäuren zu isolieren. Bisher sind für eine Isolierung von DNS aus einem solchen Ausgangsmaterial extrem arbeits-und-zeitaufwendige multiple Reinigungsschritte notwendig. Solche aufwendigen Prozeduren sind notwendig, da die Vielzahl der in Stuhlproben enthaltenen Kontaminationen mit allen bisher bekannten Methoden nicht anders entfernt werden konnten. Eine direkte und damit sehr schnelle Isolierung amplifikationsfähiger Nukleinsäure aus Stuhlproben über die Bindung der Nukleinsäuren an Trägermaterialien ist bisher nicht bekannt und bedeutet damit einen sehr großen Nachteil, da Stuhlmaterial als Quelle für zu isolierende Nukleinsäuren (vor allem genomische DNS aus abgeschilferten epithelialen Zellen der Darmwand) für die routinemäßige Gendiagnostik nicht verfügbar ist.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein universelles Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren bereitzustellen, das diese speziellen Anwendungen gestattet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß mit dem erfindungsgemäß eingesetzten Trägermaterial und unter der Verwendung unterschiedlicher chaotroper Salze alle diese Anforderungen in hervorragender Weise erfüllt werden.
Das erfindungsgemäße Verfahren wird gemäß den Ansprüchen 1-14 realisiert. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien lysiert, das Lysat mit einem nichtporösen und unstrukturierten, hochdispersen sowie homogenen chemisch reinen $SiO_2$- Träger inkubiert, der Träger mit den

gebundenen Nukleinsäuren abgetrennt und mit Pufferlösung gewaschen und nachfolgend die Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Salzkonzentration vom Träger abgelöst werden.
Die Fixierung der Nukleinsäuren erfolgt an der Oberfläche der $SiO_2$-Partikel, welche vorzugsweise einen Partikeldurchmesser von 40 nm, bei einer aktiven Oberfläche von ca. 50 $m^2/g$ aufweisen, unter Anwesenheit chaotroper Salze hoher Ionenstärken.

Damit wird es möglich, Nukleinsäuren aus

a) extrem geringen Mengen an Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien
b) aus sehr 'schwierigen' und stark mit organischen und anorganischen Verunreinigungen kontaminierten unterschiedlichen biologischen und anderen Ausgangsmaterialien wie z.B. Stuhlproben, Knochen u.a.

in einer Qualität und Quantität zu isolieren, welche nachfolgende enzymatische Manipulationen mit den isolierten Nukleinsäuren möglich werden läßt.

Es zeigte sich ebenfalls überraschenderweise, daß über die Auswahl des verwendeten chaotropen Puffers in Kombination mit dem verwendeten Trägermaterial eine Selektivität der Bindung von entweder DNS oder RNS realisiert wird. Damit kann allein durch die Wahl des für die Lyse des Ausgangsmaterials verwendeten chaotropen Salzes, das Trägermaterial für die Isolierung von DNS oder für die Isolierung RNS eingesetzt werden, wobei im methodischen Verfahrensablauf keinerlei Veränderungen durchzuführen sind. Ein solches Verhalten eines für die Bindung von Nukleinsäuren eingesetzten Materials ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Das Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren ist sehr einfach handhabbar, benötigt nur geringe apparative Ausrüstungen, bedarf keiner enzymatischen Vorbehandlung des Probenmaterials (z.B. Proteinase K Verdauung), verzichtet auf den Einsatz einer toxischen Phenol-/Chloroform-Extraktion, benötigt keine

Ethanolpräzipitation und läßt sich somit mit geringem zeitlichen Aufwand realisieren, was es gestattet, einen großen Probenumfang zu bearbeiten.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Trägermaterial mit seinen physikalischen Eigenschaften ist ideal für die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus extrem geringen Mengen an unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien, wie auch aus sehr stark mit Verunreinigungen kontaminierten Ausgangsmaterialien.
Die der Erfindung zugrunde liegenden Eigenschaften des ausgewählten Trägermaterials, welche im folgenden im Vergleich zu anderen Trägermaterialien dargestellt werden, ermöglicht damit erstmalig die Entwicklung eines universellen Isolationssystems für Nukleinsäuren (universell im Sinne der Isolierung von sowohl DNS als auch RNS, der Isolierung der Nukleinsäuren aus allen Nukleinsäuren enthaltenden biologischen und anderen Ausgangsmaterialien, der Isolierung von Nukleinsäuren aus extrem geringen Mengen an Ausgangsmaterialien, sowie der Isolierung von Nukleinsäuren aus sehr stark mit Verunreinigungen kontaminierten Ausgangsmaterialien).
Wie weiterhin aufgezeigt wird, ist ein solches universelles System nicht mit herkömmlich verwendeten Glasmaterialien (Glasmilch,Glaspulver o.ä.) realisierbar.

Das in der Erfindung verwendete Trägermaterial unterscheidet sich hinsichtlich seiner physikalischen Charakteristika grundlegend von anderen für die Isolierung von Nukleinsäuren verwendeten Trägermaterialien, bei welchen es sich i.d R. nicht um chemisch reines $SiO_2$, sondern um poröse oder nichtporöse Glasmaterialien z.B. auf der Basis von Borsilikatglas (Glasmilch) oder aus pflanzlichen mineralischen Zellwandkomponenten (Diatomenerden), welche als chromatographische Materialien speziell für Anwendungen in der Nukleinsäurenreinigung kommerziell verfügbar sind, und damit die Basis für die Herstellung von (auch der kommerziell verfügbaren) Suspensionen bilden. Alle diese Trägermaterialien sind sehr gut geeignet für Standardanwendungen, zeigen aber auf Grund ihrer physikalischen Struktur erhebliche Nachteile bzw.